Untersuchungen zum Stoffwechsel des m-Inosits

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

Vorgelegt von

HELMUT SCHRAUDOLF

aus Heilbronn

— 1956 —

5750

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 12. 1956

Dekan: Prof. Dr. H. Wielandt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bünning

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Hellmann

Meinem verehrten, leider allzu früh verstorbenen Lehrer, Herrn Professor Dr. K. Paech, bin ich dankbar für die Anregung zu diesen Untersuchungen und für sein stetes Interesse an ihrem Fortgang.

Herr Professor Dr. E. Bünning ermöglichte mir den Abschluß dieser Untersuchungen, wofür ich ihm herzlich danken möchte.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 7

A. Bestimmungsmethode 8

I. Beschreibung der Methode 9
II. Versuche zur Bestimmungsmethode 10
III. Kontrolle der Bestimmungsmethode 16

B. Versuche zur Synthese 16

I. Material und Lösungen 17
II. Versuche und Ergebnisse 18

C. Versuche zum Abbau des Inosits 20

I. Atmungsmessung und Inositabnahme 21
II. Zwischenprodukte des Inositabbaus 27
III. Inositinfiltration und Eiweißsynthese 31
IV. Inositinfiltration und Anthocyansynthese 33

D. Diskussion 34

Zusammenfassung 37

Literaturverzeichnis 37

Lebenslauf 39

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549610_0050

Einleitung

Über die Biosynthese und den Stoffwechsel des m-Inosits in höheren Pflanzen liegen nur wenig Beobachtungen vor, obgleich schon bald nach seiner ersten Isolierung aus Muskelgewebe durch Scherer[1] Inosit durch Vohl[2] auch in höheren Pflanzen gefunden und durch zahlreiche weitere Untersuchungen seine weite Verbreitung im Pflanzenreich erforscht wurde (zusammengefaßt bei Klein[3] und Czapek[4]). Die meisten der stoffwechselphysiologischen Arbeiten am Inosit beschreiben Versuche, die an tierischen Objekten oder an Mikroorganismen vorgenommen wurden. Bei diesen scheint eine Klärung leichter möglich, weil ihnen einmal gegenüber den höheren Pflanzen rationellere Stoffwechselvorgänge eigentümlich sind und damit die Zahl der Sekundärprodukte unvergleichlich niedriger ist, dann aber auch, weil bei ihnen Eingriffe in den Stoffwechsel in ihrer Wirkung leichter verfolgt werden können (Paech[5]).

Über die weite Verbreitung des Inosits hinaus geben auch zahlreiche Beobachtungen über seine Wirkung als Wuchsstoff, Vitamin, Antagonist von Zellteilungsgiften u. a. m. dazu Veranlassung, Versuche über seine Stellung im Stoffwechsel anzustellen. Ist einmal über diese Klarheit erzielt worden, so können auch über die Grundlagen seiner verschiedenen physiologischen Bedeutungen mehr als nur Vermutungen geäußert werden.

Bei der Aufnahme stoffwechselphysiologischer Untersuchungen am Inosit hielten wir die Bearbeitung folgender Fragestellungen für vordringlich:

1. Können endgültige Beweise für eine Synthese durch direkte Cyclisierung des Glucosemoleküls erbracht werden?

2. Stellt Inosit im Stoffwechsel eine leicht mobilisierbare Substanz dar oder ist seine weite Verbreitung und sein manchmal sehr hoher Anteil an der Trockensubstanz ein Zeichen besonders trägen Umsatzes?

3. Sind weitere Hinweise auf die immer wieder vermutete Aromatisierung des Inositmoleküls zu erbringen?

Die bis heute vorliegenden Ergebnisse zum Stoffwechsel des Inosits in höheren Pflanzen erlauben keine eindeutige Interpretation. Eine solche kann erst erwartet werden, wenn es gelingt, durch Isolierung von Enzymsystemen, die an Synthese oder Abbau beteiligt sind, die Zahl der in der Pflanze nebeneinander ablaufenden Prozesse zu vermindern, oder wenn radioaktive Substanzen es ermöglichen, die Bahn des Inosits im Stoffwechsel zu markieren.

Ziel unserer Untersuchungen war unter anderem, eine chemische Isolierungs- und Bestimmungsmethode auszuarbeiten und Material und Methoden aufzufinden, die als Ausgangspunkt für spätere Arbeiten mit Isotopen dienen können. Unsere Absicht, die Versuche mit Hilfe markierter Substanzen fortzusetzen, konnte nach dem überraschenden Tod von Herrn Professor Paech nicht mehr durchgeführt werden.

A) Bestimmungsmethode

Die Untersuchung des Inositstoffwechsels setzt eine ausreichend genaue, spezifische Bestimmungsmethode voraus, die es gestattet, sein Verhalten im biologischen Material zu verfolgen. Eine Zusammenstellung und Diskussion der bisher vorgeschlagenen Methoden findet sich in einer Arbeit von Böhm und Richarz[6]. Über die von diesen Verfassern angegebenen Schwierigkeiten der üblichen mikrobiologischen Bestimmungsmethode hinaus ergeben sich bei einer Inositbestimmung in höheren Pflanzen mittels Biotest weitere Nachteile. Die Extrakte höherer Pflanzen enthalten neben Inosit eine Vielzahl anderer wasserlöslicher Verbindungen, deren Natur zum größten Teil noch nicht bekannt ist. Ließen sich evtl. auch die Kohlenhydrate, die je nach Konzentration das Wachstum der Testorganismen sehr beeinflussen können, in optimaler Menge dem Nährmedium zusetzen, so ist die fördernde oder hemmende Wirkung der verschiedenen anderen Substanzen, deren Konzentration während des Versuches ebenfalls Änderungen unterworfen ist, kaum kontrollierbar. Striebel[7] fand bei einer inositbedürftigen Mutante von *Schizosaccharomyces octosporus* eine weitgehende Abhängigkeit der Wachstumskurven vom Zucker- und Aminosäurespiegel des Nährmediums; Asparaginsäure ergab vor allem einen deutlichen Effekt.

Diese Überlegungen und Erfahrungen legten die Ausarbeitung einer chemischen Bestimmungsmethode nahe. Eine solche wird erschwert durch den Mangel spezifischer Gruppen im Molekül des Inosits bei gleichzeitiger Reaktionsträgheit der alkoholischen Hydroxyle. Da m-Inosit weder optische Drehung noch ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum im ultravioletten Licht zeigt, ist auch eine direkte photometrische Bestimmung unmöglich.

Die von Scherer[8] angegebene und nach ihm benannte Reaktion, die auf einer Oxydation der Cyclite mit HNO_3 zu Rhodizonsäure und auf der Bildung deren gefärbter Erdalkalisalze beruht, wie auch die verbesserte Methode nach Gallois[9] kann wohl unter günstigen Bedingungen als qualitativer Test auf Cyclite dienen, läßt sich aber kaum zu einer quantitativen Bestimmungsmethode ausbauen.

Wir versuchten zunächst, durch Umsetzung mit CS_2 in alkalischem Medium gefärbte Xanthogenate zu erhalten, die danach papierchromatographisch aufgetrennt und photometrisch bestimmt werden konnten. Dies gelang wohl qualitativ. Versuche einer Standardisierung dieser Methode zu einer quantitativen Bestimmung schlugen schon mit Reinsubstanzen fehl.

Schon mehrmals war die Oxydation des Inosits mit Perjodsäure und die Titration des überschüssigen Oxydationsmittels mit Arsenit zu seiner Bestimmung angewandt worden (Zusammenfassung bei Böhm und Richarz[6]). Die dazu notwendige Abtrennung störender Substanzen erfolgte mittels Papierchromatographie.

Diese Methode ließ sich auf Pflanzenextrakte nicht direkt übertragen. Mit keinem Lösungsmittelgemisch konnten wir Inosit von anderen im wässerigen Extrakt vorhandenen reduzierenden Substanzen genügend

scharf abtrennen. Wir mußten versuchen, durch eine weitgehende Vorreinigung des Rohextraktes die Zahl der reduzierenden Substanzen zu vermindern. Da hauptsächlich fluoreszierende Substanzen einen dem Inosit ähnlichen Rf-Wert zeigten, während die Trennung von Kohlenhydraten ausreichend war, versprach eine Vorreinigung des Extrakts mit Kohle Erfolg.

Es gelang uns bei fast allen untersuchten Objekten, durch vorausgehende Chromatographie an einer Kohle-Celitsäule einen für die anschließende Papierchromatographie genügend vorgereinigten Extrakt zu erhalten. Diese Kombination von Säulen- und Papierchromatographie erlaubt nun auch in Extrakten höherer Pflanzen die Anwendung der Perjodatoxydation zur chemischen Bestimmung des Inosits.

I. Beschreibung der Methode

a) Extraktion:

Zur Zerstörung der Fermentaktivität wurde das Pflanzenmaterial im Trockenschrank kurz auf 110 ° erhitzt und anschließend bei 60 ° getrocknet. Darauf wurde es mit Quarzsand feinst zerrieben, das Trockenpulver in Zentrifugengläser gebracht, in diesen zweimal mit 50 cm^3 destilliertem Wasser von 80 ° extrahiert und abzentrifugiert. Die vereinigten Zentrifugate wurden im Vakuum bei 30 ° zur Trockene eingeengt. Da wir bei allen Untersuchungen die Blattfläche als Bezugseinheit wählten, konnte auf eine Trocknung bis zur Gewichtskonstanz verzichtet werden.

b) Vorreinigung:

Zur Adsorption der störenden Substanzen diente ein Gemisch von Aktivkohle (Carbo medicinalis „Merck") und Kieselgur (Schleicher-Schüll Nr. 0114) im Verhältnis 1:1. Kohle und Kieselgur wurden innig gemischt, dann 5 Minuten in destilliertem Wasser aufgekocht und in ein mit Asbest abgedichtetes Glasrohr eingeschlämmt. Die Dimension der Säule richtete sich nach der Menge des aufgearbeiteten Pflanzenmaterials. Für die von uns verarbeiteten Proben von 0,1—1,0 g Frischgewicht erwies sich eine Säule von 1,0 cm ⌀ und 6,0 cm Höhe als besonders geeignet.

Nachdem diese Säule mit 50 cm^3 destilliertem Wasser gewaschen worden war, brachten wir den in kleinen Portionen mit insgesamt 15 cm^3 Wasser aufgenommenen Rohextrakt auf die Kohle. Danach wurde bei schwachem Überdruck mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Der gesamte Inosit fand sich in den ersten 80 cm^3 des Eluats.

c) Papierchromatographie:

Den durch Kohle gereinigten Extrakt engten wir erneut im Vakuum bei ca. 30 ° zur Trockene ein und nahmen ihn dann mit genau 5 cm^3 destilliertem Wasser auf. Von dieser Lösung verwendeten wir je nach Inositkonzentration 0,5—1,0 cm^3 für die weitere Bestimmung. Die Lösung wurde mit einer Mikropipette in einem 11 cm langen Startstrich auf einem Papierstreifen (Schleicher-Schüll Nr. 2043 b Mgl) von 16 cm Breite und 45 cm Länge quer aufgetragen. Auf den freien Randstreifen brachten wir mit 100 γ Reininosit als Vergleichssubstanz. Chromatographiert wurde absteigend mit einem Lösungsmittelgemisch Aceton:Butanol:Wasser (70:10:20). Um

eine genügend scharfe Trennung zu erhalten, wurden Durchlaufchromatogramme gemacht. Das Lösungsmittel konnte vom ausgezackten Rand des Papiers abtropfen. Zur ständigen Kontrolle der Wanderungsstrecke der nicht sichtbaren Substanzen wurde neben dem Reininosit ein Tropfen einer 0,1%igen Methylenblaulösung aufgetragen. Methylenblau hat im angegebenen Lösungsmittel einen der Glucose ähnlichen Rf-Wert. Hatte dieser Methylenblaufleck im Durchlaufchromatogramm das Ende des Papierstreifens erreicht, war die Trennung genügend scharf. Nun wurde der Randstreifen abgetrennt und mit ammoniakalischer Silbernitratlösung (5%) besprüht. Nach Erhitzen auf 105 ° wurde die Lage des Testinosits als brauner Fleck sichtbar und der entsprechende Streifen der aufgetrennten Lösung konnte ausgeschnitten werden.

d) Elution und Oxydation:

Der so erhaltene Streifen wurde in kleine Stückchen zerschnitten, mit 30 cm^3 destilliertem Wasser extrahiert, über einen Porzellanfiltertiegel (A_2) in einen 250 cm^3-Meßkolben filtiert und der Rückstand mit weiteren 30 cm^3 Wasser nachgewaschen. Die Inositlösung wurde mit 2 cm^3 einer 0,025 n $NaJO_4$-Lösung und 2 cm^3 20%iger Schwefelsäure versetzt und 8 Stunden bei 50° im Trockenschrank belassen. Danach wurde der Ansatz mit 25 cm^3 $NaHCO_3$-Lösung (12%ig) auf PH 6 gebracht und zur Vertreibung des gelösten CO_2 mehrmals umgeschüttelt.

e) Bestimmung:

2 cm^3 1 n Kaliumjodidlösung wurden dem Ansatz zugesetzt und zur Strichmarke aufgefüllt. Die hier angegebenen Mengen eignen sich für die Bestimmung von 0,1—1,0 mg Inosit. Für Bestimmungen von 0,01—0,5 mg Inosit machten wir den Ansatz in 50 cm^3-Meßkölbchen unter Zusatz von 3 cm^3 0,0025 n $NaJO_3$ und 1 cm^3 H_2SO_4 von 10%, neutralisierten mit 5 cm^3 $NaHCO_3$ (12%) und setzten 1 cm^3 1 n Kaliumjodidlösung zu. Zu jeder Versuchsreihe wurde eine Eichkurve mit Reininosit aufgestellt, auf welche die erhaltenen Werte bezogen wurden.

Der Inosit wurde photometrisch aus der Menge des nicht umgesetzten Oxydationsmittels bestimmt. Die Extinktion der Jodlösungen wurde bei 450 mμ im Spektralphotometer (Zeiss-Opton) in Küvetten mit 1,0 cm ϕ bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden an Hand der Vergleichskurve auf die entsprechenden Inositmengen umgerechnet.

II. Versuche zur Bestimmungsmethode

a) Extraktion:

Da wir uns bei unseren Untersuchungen auf die Bestimmung des frei in der Pflanze vorliegenden oder des von uns der Pflanze zugesetzten Inosits beschränkten, schien eine wässrige Extraktion ausreichend. Die große Thermostabilität des Inosits erlaubte es, das Pflanzenmaterial zur Zerstörung der Enzyme auf 110 ° zu erhitzen.

Zur Kontrolle der quantitativen Extraktion wurden Blätter von *Juglans nigra* (1 g Frischgewicht), die sich durch einen besonders hohen Inositgehalt auszeichnen, getrocknet, zerrieben und mehrmals mit je 50 cm^3 destilliertem Wasser extrahiert. Die einzelnen Extrakte wurden zur Trok-

kene eingeengt, mit 0,5 cm³ Wasser aufgenommen und diese Lösung papierchromatographisch aufgetrennt. Nach der zweiten Extraktion war Inosit nicht mehr nachweisbar. Reduzierende Zucker fanden sich noch im vierten Extrakt.

Wurde an Stelle des Wassers 80 %iges Äthanol verwendet, wie es von William u. Mitarb.[10] zur Extraktion von Monosacchariden vorgeschlagen wurde, ergab die Auftrennung des Extraktes keine Vorteile gegenüber der wässrigen Extraktion.

b) Vorreinigung:

Seit langem dient Tierkohle zur Reinigung und Klärung von Pflanzenextrakten. Whistler und Durso[11] bauten auf Arbeiten von Tiselius[12] eine Methode zur Fraktionierung von Kohlenhydraten an einer Kohle-Celitsäule aus. Die Anwendung dieses Verfahrens zur Vorreinigung unserer inosithaltigen Extrakte versprach einmal die Entfernung der störenden reduzierenden Substanzen, die auf Grund ihrer Fluoreszens und ihres niedrigen Rf-Wertes phenolische Glycoside sein müssen, dann aber auch eine weitgehende Abtrennung von Di- und Trisacchariden.

Um den Verlauf der Elution zu bestimmen, wurden je 10 g Inosit, Glucose und Saccharose in 10 cm³ Wasser gelöst und wie beschrieben an einer Kohle-Celitsäule aufgetrennt. Das Eluat wurde in Fraktionen von 10 cm³ abgefangen. Diese Fraktionen wurden im Vakuum eingeengt und nach papierchromatographischer Trennung der Anteil der einzelnen Kohlenhydrate durch Oxydation mit Perjodsäure bestimmt. Der zugesetzte Inosit fand sich in Fraktion 1—7, die Glucose in Fraktion 9—14. Der Saccharoseanteil konnte erst mit 5 %igem Äthanol eluiert werden. Den Verlauf der Elution mit Wasser macht Fig. 1 deutlich:

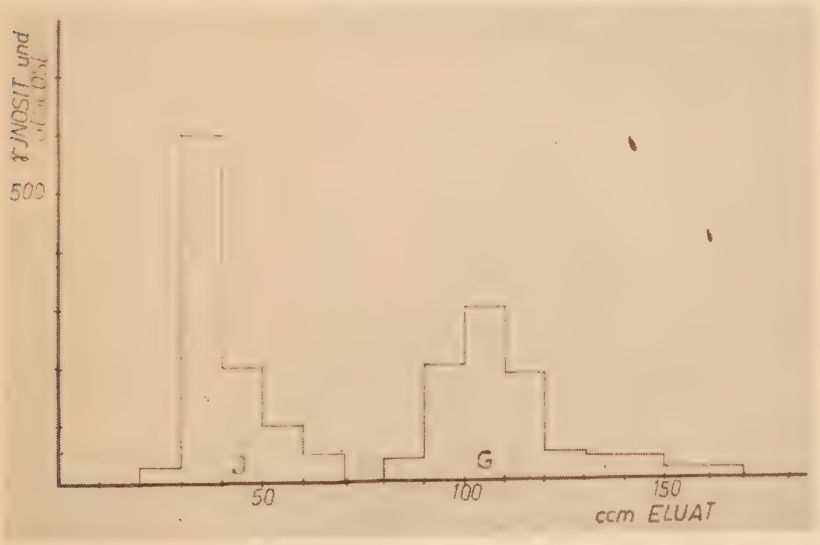


Fig. 1: Auftrennung von Inosit und Glucose an einer Kohle-Celitsäule.
I = Inosit, G = Glucose.

Verluste bei der Reinigung am Kohle-Kieselgurgemisch traten nicht auf. Die bei Kontrollversuchen beobachteten Unterschiede lagen im Fehlerbereich der Methode.

Pflanzenextrakte waren nach Passieren der Säule meist vollständig entfärbt. Die bei der anschließenden Bestimmung störenden fluoreszierenden Stoffe wurden an der Säule festgehalten. Zur Kontrolle wurden Extrakte inositfreier Pflanzen über die Säule gereinigt und anschließend papierchromatographisch aufgetrennt. Im Bereich des Rf-Wertes des Inosits konnten keine fluoreszierenden oder Silbernitrat reduzierenden Flecken mehr beobachtet werden.

2 g (Frischgewicht) Blätter von *Saxifraga crassifolia* wurden mit 50 cm^3 Wasser extrahiert. Je 25 cm^3 der erhaltenen Lösung wurden sofort bzw. nach Reinigung über die Kohle-Celitsäule papierchromatographisch aufgetrennt. Die dem Rf-Wert des Inosits entsprechenden Zonen wurden ausgeschnitten und die in ihnen enthaltenen Stoffe der Oxydation mit Perjodsäure unterworfen. Die Reduktionswerte der beiden Ansätze, umgerechnet auf Inosit, ergaben:

Ungereinigter Extrakt	54 γ
Vorgereinigter Extrakt	4 γ

Die Differenz beider Werte ist ein Ausdruck dafür, wie große der Anteil störender Substanzen auch nach der Auftrennung mittels Papierchromatographie noch sein kann.

c) Papierchromatographie und Elution:

Das zur Chromatographie verwendete Aceton-Butanol-Wasser-Gemisch erwies sich durch einen hohen Rf-Wert des Inosits bei genügend deutlicher Abtrennung der Zucker und Zuckeralkohole (Tab. 1) als für unsere Zwecke besonders geeignet. Auch sind bei einem einphasigen Gemisch keine langen Angleichungszeiten notwendig.

Inosit	0,27
Lactose	0,35
Mannose	0,36
Saccharose	0,45
Glucose	0,49
Fructose	0,51
Mannit	0,54

Tab. 1: Rf-Werte von Zuckern und Zuckeralkoholen mit Aceton:Butanol:Wasser (70:10:20) (Schleicher-Schüll Nr. 2043b Mgl).

Es war nun zu kontrollieren, ob bei der chromatographischen Auftrennung nach anschließender Elution ein Inositverlust auftritt. Bei allen Kontrollversuchen wurden zunächst regelmäßig zu hohe Inositmengen wiedergefunden. Die Ursache dafür lag in wasserlöslichen Verunreinigungen des Papiers, die mit Perjodat reagierten. Eine genaue Untersuchung dieses „Leerwertes" ergab, daß er weitgehend von der Papiersorte abhängig ist, jedoch auch bei gleicher Sorte mit den verschiedenen Lieferungen schwankt. In Tab. 2 sind Reduktionswerte verschiedener Papiersorten, be-

zogen auf γ Inosit wiedergegeben. Sie resultieren aus 50 cm² großen Streifen, die nach Durchströmen mit Lösungsmittel an den dem Rf-Wert des Inosits entsprechenden Stellen entnommen wurden.

Wurden die Papierbogen vor ihrer Verwendung mit destilliertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet, so waren die Unterschiede des „Leerwertes" innerhalb einer Papiersorte so gering, daß dieser als Konstante vom jeweiligen Inositwert abgezogen werden konnte.

Papiersorte	„Leerwert" bezogen auf γ Inosit ungewaschen	gewaschen
Schleicher-Schüll 2043 b Mgl	28	15
	29	15
	36	16
	34	17
Schleicher-Schüll 2040	94	30
	65	32
Schleicher-Schüll 2045	20	13

Tab. 2: Reduktionswerte (umgerechnet auf γ Inosit) von 50 cm² Chromatographierpappier.

Bei allen Bestimmungen mit Schleicher-Schüll 2043 b Mgl Papier wurden, entsprechend den oben ermittelten Werten, 0,3 γ cm² ausgeschnittenen Papiers vom Analysenwert abgezogen.

Kontrollversuche über Verluste während der papierchromatographischen Auftrennung und bei der Elution ergaben nun eine ausreichende Genauigkeit (Tab. 3).

aufgetragen	γ Inosit gefunden	Differenz	% Fehler
50	48	— 2	4
50	47	— 3	6
100	98	— 2	2
100	106	+ 6	6
100	102	+ 2	2
200	200	0	0
200	193	— 7	3,5
200	204	+ 4	2
200	198	— 2	1

Tab. 3: Bestimmung von Inosit nach papierchromatographischer Trennung und Elution.

d) Oxydation und Bestimmung:

Der Verlauf der Perjodatoxydation von Polyalkoholen ist noch nicht endgültig geklärt. Den ursprünglich von Fleury und Lange[13] angenom-

menen stöchiometrischen Verlauf nach Gleichung 1

(1) $C_6H_6(OH)_6 + 6\ HJO_4 \rightarrow 6\ HCO_2H + 6\ HJO_3$

widerlegten die Ergebnisse eingehender Untersuchungen.

1937 hatten Fleury und Joly[14] intermediär auftretende Aldehydgruppen und einen maximalen Verbrauch von 6,76 Mol O_2 pro Mol Inosit beobachtet. Der Umstand, daß davon 5,5 Mol in den ersten 60 Minuten verbraucht wurden, während die weitere Reaktion nur langsam verlief, veranlaßte Fleury und Balatre[15] zur Annahme von zwei Reaktionsphasen: einer sehr schnell verlaufenden Oxydation zu Glycollsäure und Ameisensäure (Gleichung 2), der eine langsame Oxydation der Glycollsäure zu Ameisensäure und CO_2 folgt (Gleichung 3):

(2) $C_6H_6(OH)_6 + 4O \rightarrow 2\ CH_2OHCO_3H + 2\ HCO_2H$

(3) $2\ CH_2OHCO_2H + 4O \rightarrow 2\ HCO_2H + 2CO_2 + 2\ H_2O.$

Der Verbrauch von 6,76 Mol O_2 bei der Oxydation von Inosit bleibt auch durch diese Annahme ungeklärt.

Der unstöchiometrische Verlauf zusammen mit dem zeitlich uneinheitlichen Ablauf der Reaktion, der seinerseits wieder temperatur- und PH-abhängig ist, erschwert eine Standardisierung der Methode. Platt und Glock[16], wie auch Böhm und Richarz[6] streben eine solche durch strenge Temperatur- und Zeitkonstanz, zusammen mit einer experimentell ermittelten optimalen KJO_4-Konzentration an. Wir verzichteten auf eine Standardisierung und stellten bei jeder Bestimmung aus zwei eingemessenen Inositmengen eine Eichkurve auf, zumal auch die angesetzte Perjodatlösung über einen längeren Zeitraum eine Abnahme ihres Reduktionswertes zeigte.

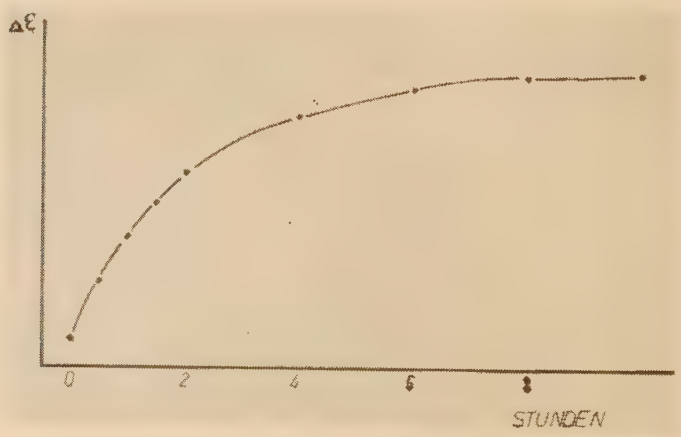


Fig. 2: Zeitlicher Verlauf der Oxydation des Inosits durch 0,025 n KJO_4-Lösung. t 50°

Den zeitlichen Ablauf der Reaktion gibt Fig. 2 wieder. Je 250 Inosit wurden nach den oben angegebenen Bedingungen der Oxydation unterworfen. Zuerst im Abstand von 30 Minuten, dann jeweils nach 2 Stunden wurde die Reaktion bei einem der Ansätze abgebrochen und nach Zugabe von KJ die Extinktion der Jodlösung (ε) gemessen. In Fig. 2 wurde jeweils die Differenz ($\Delta\varepsilon$) zwischen dieser Extinktion und der Extinktion eines Parallelansatzes ohne Inositzugabe (Δo) angegeben. Aus den erhaltenen Werten ist ersichtlich, daß nach 8 Stunden in der Zeiteinheit nur noch eine kleine Perjodatmenge umgesetzt wird. Da der Anstieg der Eichkurve und damit die Empfindlichkeit der Bestimmungsmethode der in der Zeichnung angegebenen Differenz der Extinktion von Nullwert und Inositansatz ($\Delta\varepsilon$) entspricht, war über eine 8stündige Oxydation hinaus keine nennenswerte Steigerung der Empfindlichkeit mehr zu erwarten. Die Oxydation konnte daher bei allen unter diesen Bedingungen durchgeführten Versuchen nach 8 Stunden abgebrochen werden.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse des titrimetrischen Verfahrens, das bis jetzt von allen Autoren zur Bestimmung des bei der Oxydation nicht umgesetzten Perjodats angewandt wurde, mit einer photometrischen Bestimmung ergab sich im Bereich von 50 γ und mehr Inosit kein Unterschied in der Genauigkeit beider Methoden. Im Bereich von 0—50 γ blieb unter den oben angegebenen Bedingungen der Fehler immer unter 5% (Tab. 4). Dies scheint uns, über die Zeitersparnis bei Serienbestimmungen hinaus, ein weiterer Vorteil gegenüber dem bisher angewandten titrimetrischen Verfahren zu sein.

Wesentlich für die Genauigkeit der photometrischen Bestimmung kleinster Inositmengen ist, Lösungen und Ansatzvolumen so aufeinander abzustimmen, daß die Messung sich im Bereich des kleinsten Fehlers, also innerhalb einer Extinktion von = 0,4—0,6 vollzieht. (K o r t ü m [17]).

zugesetzt	γ Inosit gefunden	Abweichung	% Fehler
3,125	3,2	+ 0,075	+ 2,4
6,25	6,5	+ 0,25	+ 4,0
12,5	13,0	+ 0,5	+ 4,0
12,5	12,5	0	0
25,0	25,7	+ 0,7	+ 2,8
25,0	24,2	— 0,8	— 3,2
50,0	50,0	0	0
50,0	50,8	+ 0,8	+ 1,6

Tab. 4: Bestimmung von Inositmengen von 0—50 γ nach papierchromatographischer Auftrennung und Elution.

III. Kontrolle der Bestimmungsmethode

Nachdem ein Vorversuch gezeigt hatte, daß Blätter von *Wistaria sinensis* keinen Inosit enthalten, teilten wir das Mazerat von 5 g (Frischgewicht) dieser Blätter in 4 Portionen auf und gaben zu jeder 0,5 mg Inosit. Die einzelnen Portionen wurden dann nach der angegebenen Bestimmungsmethode aufgearbeitet und der zugesetzte Inosit zurückbestimmt. Die Ergebnisse dieser Bestimmung zeigt Tab. 5:

zugesetzt	γ Inosit gefunden	Abweichung	% Fehler
500	480	— 20	— 4
500	485	— 15	— 3
500	510	+ 10	+ 2
500	490	— 10	— 2

Tab. 5: Kontrollbestimmung von 500 γ Inosit, der Blättern von *Wistaria sinsensis* zugesetzt wurde.

Eine weitere Kontrollbestimmung wurde mit Blättern von *Juglans regia* vorgenommen, die sich durch einen hohen Insitgehalt auszeichnen. 2 g (Frischgewicht) dieser Blätter wurden mit Quarzsand zerrieben und mit insgesamt 100 cm^3 destilliertem Wasser extrahiert, in je 20 cm^3 dieses Extraktes wurde der Inosit bestimmt; die Ergebnisse dieser Bestimmung zeigt Tab. 6:

Ansatz	γ Inosit
1	390
2	390
3	380
4	380

Tab. 6: Kontrollbestimmung des Inosits in 0,4 g (Frischgewicht) Blättern von *Juglans regia*.

Aus beiden Kontrollbestimmungen geht hervor, daß die von uns angewendete Bestimmungsmethode den Anforderungen an die Genauigkeit stoffwechselphysiologischer Untersuchungen genügt.

B) Versuche zur Synthese

Die weite Verbreitung des m-Inosits und seiner Derivate in höheren Pflanzen machen eine verhältnismäßig zentrale Stellung im Stoffwechsel wahrscheinlich. Nachdem Dangschat[18] und Posternak[19] die Kon-

figuration des m-Inosits aufklären konnten, bekam die schon vorher geäußerte Hypothese eines direkten Zusammenhanges zwischen D-Glucose und m-Inosit eine neue Stütze.

Im Tierversuch hatten schon Needam[20] und Snell u. Quarless[21] nach Injektion von Glucose in bebrütete Hühnereier eine Steigerung des Inositgehaltes feststellen können. Diese Angaben wurden von Daughaday, Larner u. Hartnet[22] bestätigt und bei Rattenembryonen derselbe Effekt beobachtet. Halliday u. Anderson[23] berichten über eine Inositzunahme nach Injektion von D-Glucose in das Gewebe reifer Ratten. Bei Hunden und Ratten, die mit Phlorrhizin diabetisch gemacht worden waren, wurde markierter Inosit im Harn als Glucose ausgeschieden (Greenwald u. Weiss[24]; Stetten u. Stetten[25]). Bei höheren Pflanzen entsprechen diesen Versuchen die Untersuchungen von Kursanow[26], [27], der nach Infiltration von Glucose in Teeblätter ebenfalls eine deutliche Zunahme des Inositgehaltes feststellen konnte.

Während all diese Arbeiten nur einen mehr oder weniger engen Zusammenhang zwischen Inosit und Glucose wahrscheinlich machen, aber keinen endgültigen Beweis für eine direkte Cyclisierung erbringen können, berichten Fernandez, Izquierdo u. Martinez[28] über ein aus *Lactuca virosa* isoliertes Enzymsystem, das in vitro eine Cyclisierung der D-Glucose zu nicht näher definierten Cycliten bewirkt. Dieses von ihnen als Cyclase bezeichnete System konnte bis heute aus keinem anderen Material isoliert werden. Es schien uns daher angebracht, die Versuche der genannten Verfasser zu reproduzieren und darüber hinaus den von ihnen zum Nachweis der entstandenen Cyclite angewandten Scherer-Test durch eine papierchromatographische Auftrennung der evtl. bei der Enzymeinwirkung entstandenen Produkte zu ersetzen.

I. Material und Lösungen

a) Pflanzenmaterial:

Verwendung fanden Blätter von *Lactuca virosa* aus dem Botanischen Garten der Universität Tübingen. Da in der zu reproduzierenden Arbeit keine Angaben über das Alter der verwendeten Blätter gemacht worden waren, wurde ein Versuch im Frühjahr 1955 mit jungen Rosettenblättern, einer im Sommer 1955 mit Sproßblättern angesetzt. Verwendet wurde bei beiden Versuchen 400 g (Frischgewicht) Blattmaterial.

b) Ansätze:

Phosphatpuffer nach Sörensen pH 5,8
Acetatpuffer pH 5,8
2%ige Glucoselösung.

c) Chromatographie:

Die chromatographische Auftrennung erfolgte auf 16 cm breiten und 45 cm langen Streifen (Schleicher-Schüll 2043 b Mgl). Als Lösungsmittel-

gemisch diente Butanol:Eisessig:Wasser (40:10:50) und Aceton:Butanol:Wasser (70:10:50).

Sprühreagentien: Ammoniakalisches Silbernitrat (5%ige Lösung in 15% NH_4OH).

Reagens nach Scherer-Gallois für Papier-Chromatographie (Fleury, Courtois u. Malangeau[29]).

Lösung 1: 10 g HgO + 10 g HNO_3 (Dichte 1,4) mit destilliertem Wasser auf 100 cm^3 gebracht.

Lösung 2: 15 cm^3 einer 10%igen wässrigen Bariumacetatlösung mit Eisessig auf 100 cm^3 aufgefüllt

II. Versuche und Ergebnisse

Nach der Vorschrift von Fernandez u. Mitarbeiter[28] wurden 400 g Blätter von *Lactuca virosa* im Multimix mit 150 cm^3 5%igem Äthanol homogenisiert. Dabei achteten wir darauf, daß die Temperatur im Multimix 30° nicht überschritt. Zum Homogenisat gaben wir 500 cm^3 Äthanol (5%) und ließen dieses Gemisch bei Zimmertemperatur 48 Stunden stehen. Darauf wurde durch ein Faltenfilter filtriert und das Filtrat mit der doppelten Menge 96%igem Äthanol versetzt. Es fiel dabei eine braune, flockige Masse aus, die nach Dekantieren der überstehenden Flüssigkeit abzentrifugiert und zunächst mit Äthanol, darauf mit peroxydfreiem Äther gewaschen und an der Luft getrocknet wurde. Das so gewonnene hellbraune Pulver sollte das beschriebene Fermentsystem enthalten. Es wurde im Vakuumexsikkator über H_2SO_4 conc. aufbewahrt.

Je 60 mg des getrockneten Fermentextraktes wurden zu 50 cm^3 einer 2%igen Glucoselösung gegeben, die mit Phosphatpuffer auf pH 5,8 gebracht worden war. Ein Ansatz wurde als Blindprobe zur Hemmung der Enzymaktivität sofort eingefroren. Sechs weitere Ansätze, von denen vier je zwei Tropfen Toluol erhielten, wurden bei 37° in den Thermostaten gestellt und mehrmals täglich umgeschüttelt.

Danach sollte eine teilweise Cyclisierung der Glucose zu einem nicht näher definierten Cyclit stattgefunden haben.

Zur papierchromatographischen Trennung trugen wir auf die Papierstreifen Startpunkte mit 0,01 cm^3, 0,03 cm^3, 0,05 cm^3 und 0,1 cm^3 aus jedem Ansatz auf. Bei jeder Trennung dienten als Vergleichssubstanzen zu 100 γ Inosit auf 0,03 cm^3 der eingefrorenen Lösung. Von jedem Ansatz wurden zwei Chromatogramme mit Aceton:Butanol:Wasser, zwei mit Butanol:Eisessig:Wasser entwickelt. Nach Besprühen mit ammoniakalischem Silbernitrat und Erhitzen auf 105° traten in allen Ansätzen als reduzierende Flecken nur die zugesetzte Glucose und der Testinosit auf. Beim Besprühen eines zweiten Chromatogrammes mit Reagens nach Scherer-Gallois konnte außer beim Testinosit keine Reaktion auf Cyclite erhalten werden.

Da die als Puffer zugesetzten Phosphate sich auf dem Chromatogramm als störende weiße Flecken bemerkbar machten und die Gefahr bestand, daß sie

eventuell entstandene Cylite verdecken könnten, trennten wir die Lösungen nach Vorschrift von Fernandez u. Mitarb.[28] mit Alkohol-Äther auf. Hierzu wurden die einzelnen Ansätze mit einem Gemisch von Äthylalkohol und Äther (1:1) (genaue Mischungsverhältnisse werden in der Originalarbeit von Fernandez u. Mitarb.[28] nicht angegeben) auf das 7fache ihres Volumens gebracht und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Die vorhandenen Cyclite sollten in der leicht braun gefärbten Lösung zu finden sein, während die störenden Phosphate ausgefallen waren.

Die erhaltenen Lösungen wurden eingeengt und wie oben mittels Papierchromatographie aufgetrennt. In keinem der Lösungsmittelgemische und mit keinem Sprühreagens ließen sich gegenüber der Testlösung neuentstandene Flecken nachweisen. Die Reaktion auf Cyclite blieb negativ. Da weiterhin die Möglichkeit bestand, daß die geringe Menge gebildeter ringförmiger Substanzen mit den ausfallenden Phosphaten mitgerissen und damit dem Nachweis entzogen worden waren, machten wir einen neuen Ansatz mit Acetatpuffer. Dadurch konnte auch eine oft beobachtete Hemmwirkung anorganischen Phosphats auf Enzymreaktionen ausgeschlossen werden. Auch bei diesen Ansätzen konnte — auch nach Auftrennung mit Alkohol:Äther — keine neugebildete Substanz nachgewiesen werden.

Einem zu starken Einengen der Ansätze waren zunächst durch die erheblichen Glucosemengen, die in zu hoher Konzentration eine scharfe Auftrennung im Chromatogramm erschwerten, Grenzen gesetzt. Platt u. Glock[16] hatten bei der Bestimmung des Inosits schon von seiner Eigenschaft, von Hefe nicht angegriffen zu werden, Gebrauch gemacht. Sie hatten bei ihren Bestimmungen überschüssige Zucker durch Vergärung mit Hefe entfernt. Es schien uns angebracht, den Glucoseüberschuß auf dieselbe Weise zu verringern, um damit eine stärkere Konzentration der Enzymansätze vor der Auftrennung zu ermöglichen.

2 g Bäckerhefe wurden 4mal mit 10 cm³ destilliertem Wasser gewaschen und abzentrifugiert, dann mit weiteren 10 cm³ Wasser aufgeschüttelt und von dieser Suspension je 2 cm³ zu 10 cm³ der auf Cyclite zu untersuchenden Lösungen gegeben. Die Lösungen standen anschließend 7 Stunden im Themostaten bei 37°. Darauf wurde wie oben angegeben aufgearbeitet und chromatographiert. Auch nach dieser Abänderung der Methode konnten Inosit oder Cyclite nicht nachgewiesen werden. Zwei neu auftretende reduzierende Substanzen erwiesen sich als Umsetzungsprodukte der Glucose bei der Hefegärung. Ihr chemischer Charakter wurde nicht weiter bestimmt.

Da Kursanow[26], [27] bei seinen Versuchen mit Saccharose und glycosidisch gebundener Glucose gegenüber Glucose eine gesteigerte Inositsynthese erzielte, was er auf den erhöhten Energiegehalt der Glycosidbindung zurückführt, wurden weitere Enzymversuche mit Saccharose und mit ß-Glucose-1-Phosphat angesetzt. Auch bei ihnen erzielten wir nur negative Ergebnisse.

Die von Fernandez u. Mitarb.[28] angewandte direkte Probe auf Cyclite ergab in keinem unserer Ansätze einen eindeutigen Nachweis. Es trat zwar beim Scherer-Gallois-Test in einigen Fällen eine Farbvertiefung der an sich schon gelben Lösung auf, doch konnten wir einen Umschlag dieser Färbung nach rot, wie er für den Nachweis von Cycliten verlangt wird, nie beobachten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß ein cyclisierendes Enzym oder Enzymsystem in *Lactuca virosa* durch die von uns angewendeten Abänderungen der Methode von Fernandez u. Mitarb.[28] nicht nachgewiesen werden konnte. In keinem Fall ließ sich durch papierchromatographische Auftrennung oder im direkten Test ein neu entstandenes Cyclit nachweisen.

Auch der von Kursanow[26], [27] beobachteten Inositzunahme nach Zuckerfütterung scheint keine allgemeine Gültigkeit zuzukommen. Weder bei Primärblättern von *Phaseolus multiflorus* noch bei *Juglans nigra* gelang es uns, durch Infiltration mit Saccharose eine Inositsynthese anzuregen.

C) Versuche zum Abbau des Inosits

Wie bei der Synthese liegen auch über den Abbau des Inosits konkrete experimentelle Befunde nur für tierische Organismen und für Mikroorganismen vor. Im Tierversuch konnte ein Übergang von Inosit in Glucose mittels markierter Substanzen bewiesen werden. Ob es sich dabei um eine oxydative Ringsprengung oder um eine Resynthese aus kleineren Inositspaltprodukten handelt, bleibt dahingestellt. Bei Mikroorganismen gaben Arbeiten von Magasanik[30] Aufklärung über die ersten Abbaustufen. Danach treten zunächst Mono- und Diketoverbindungen auf, die dann zu einem C_3- und C_2-Körper und CO_2 aufgespalten werden. Dieser Abbauweg scheint bei Mikroorganismen verbreitet zu sein.

Über den Abbau des Inosits bei höheren Pflanzen liegen noch keine Arbeiten vor. Die Befunde von Kursanow[26], [27] beziehen sich auf eine direkte Aromatisierung des Rings, und die Abnahme zugefütterten Inosits wird mit dieser erklärt. Der Beweis einer Ringspaltung und Einbeziehung der Spaltprodukte in den Atmungsstoffwechsel ist in höheren Pflanzen ohne Anwendung markierter Substanzen eindeutig wohl nicht zu führen. Durch Infiltration und Inosit in Blattstücke bei gleichzeitiger Kontrolle der Atmungsintensität und der Inositabnahme schien uns eine Möglichkeit gegeben, der Klärung dieser Frage etwas näher zu kommen.

War es darüberhinaus möglich, durch Infiltration mit Inosit eine Synthese anzuregen, die sonst nur nach Infiltration mit Zuckern zu beobachten war, so war dadurch ein weiterer Hinweis auf seine Einbeziehung in den allgemeinen Atmungsstoffwechsel gegeben.

Ferner konnte untersucht werden, ob bei natürlich vorkommendem Inosit Anzeichen für eine Wiederverwendung im Atmungsstoffwechsel zu finden sind.

I. Atmungsmessung und Inositabnahme

a) Material und Methode:

Als Untersuchungsobjekte dienten sowohl Pflanzen, die normalerweise freien Inosit enthalten *(Parthenocissus quinquefolia, Digitalis purpurea, Phaseolus multiflorus, Spinacea oleracea)*, wie auch solche, in denen bei einer vorhergegangenen Auftrennung kein freier Inosit nachgewiesen werden konnte *(Saxifraga crassifolia)*. Aus den Blättern wurden mit Hilfe eines Korkbohrers flächengleiche Scheiben von 1 cm^2 ausgestanzt. Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurden für die Atmungsmessungen je drei Blattscheiben aus benachbarten Bereichen entnommen und für Glucose-, Inosit- und Wasserinfiltration aufgeteilt. Gemessen wurde die Atmung in sechs Blattscheiben.

Zur Kontrolle der Inositabnahme wurden je nach Blattdicke des untersuchten Materials 20—30 Blattscheiben infiltriert. Auch hier wurde vergleichbares Material durch gleichmäßiges Verteilen sich entsprechender Blattstücke erhalten.

Zur Atmungsmessung wurden die Blattscheiben mit 0,2 m Lösungen von Glucose oder Inosit bzw. mit destilliertem Wasser infiltriert. Nach Ausdunsten des Lösungsmittels wurden sie auf die infiltrierte Lösung in Petrischalen — mit der Blattunterseite nach oben — aufgelegt. Zur Vermeidung von Pilz- und Bakterienwachstum wurden die Lösungen alle 24 Stunden erneuert und die Blattscheiben vor dem Umbetten mit destilliertem Wasser abgespült.

Die Messungen wurden in einer Warburg-Apparatur (System Möhle) durchgeführt. Die Ablesegenauigkeit beträgt 0,5 mm; dies entspricht bei einer Gefäßkonstanten von durchschnittlich 2 etwa 1 mm^3 Sauerstoff. Gemessen wurde in Warburggefäßen in Erlenmeyer-Form jeweils über 4 Stunden in einstündigen Intervallen. Die Blattscheiben wurden im Außenraum auf Filtrierpapier ausgelegt, das mit 0,2 cm^3 destilliertem Wasser angefeuchtet worden war. Der Innenraum der Gefäße enthielt 0,2 cm^3 KOH (10% ig) bzw. ebenfalls destilliertes Wasser. Die Temperatur des Wasserbades betrug während der Messung 24 ± 0,01 °. Zwischen den Messungen standen die Blattscheiben in einem Konstantraum mit 24 ° und bei 12stündigem Hell-Dunkel-Wechsel.

Die Bestimmung der Inositabnahme erfolgte nach der oben angegebenen Methode. Die infiltrierten Blattscheiben wurden nach dem Ausdunsten in feuchten Kammern in einen Konstantraum von 24 ° bei einem 12stündigen Hell-Dunkel-Wechsel gebracht. Alle 24 Stunden wurde ein Ansatz nach kurzem Erhitzen auf 110° bei 60° getrocknet und aufgearbeitet.

b) Ergebnisse:

Die mit Inosit infiltrierten Blattscheiben zeigten in allen untersuchten Objekten gegenüber der Wasserkontrolle eine verstärkte Atmung. Die durch Glucose-Infiltration angeregte Atmungssteigerung war jedoch im-

mer größer als die durch Inosit verursachte. Ein Beispiel für den Verlauf der Atmungskurven nach Infiltration mit Inosit, Glucose und Wasser gibt Fig. 3. Der von Eberhardt[31] beobachtete leichte Atmungsanstieg der Wasserkontrolle trat bei unseren Versuchen nur selten ein. Meistens war sogar ein Rückgang der Atmungsintensität bei der Wasserkontrolle zu verzeichnen. Dies ist wenigstens teilweise auf Mangel an Atmungsmaterial zurückzuführen, da dieser Abfall schneller erfolgt, wenn die Blattscheiben nicht im 12stündigen Hell-Dunkel-Wechsel, sondern im Dauerdunkel aufbewahrt werden (Fig. 4). Aber auch in diesem Fall ist die Atmung der glucose- und inositinfiltrierten Blattscheiben gegenüber der Wasserkontrolle deutlich erhöht.

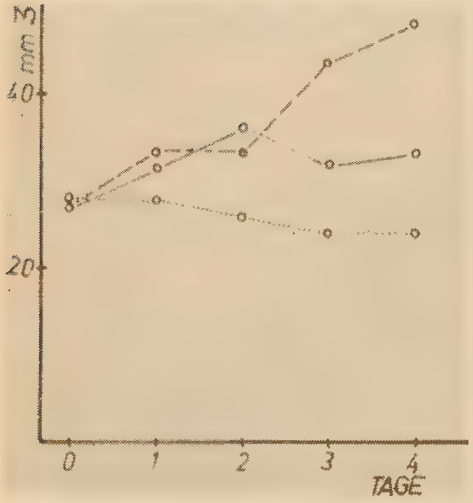


Fig. 3: Atmung von Digitalis-Blattscheiben, infiltriert mit 0,2 m Inosit, 0,2 m Glucose und Wasser. Ordinate: Differenz zwischen Glucose- und Inosit-infiltrierten Blattscheiben und der Wasserkontrolle in mm^3O_2-Aufn./6 cm^2/Stunde. Abszisse: Tage nach Infiltration

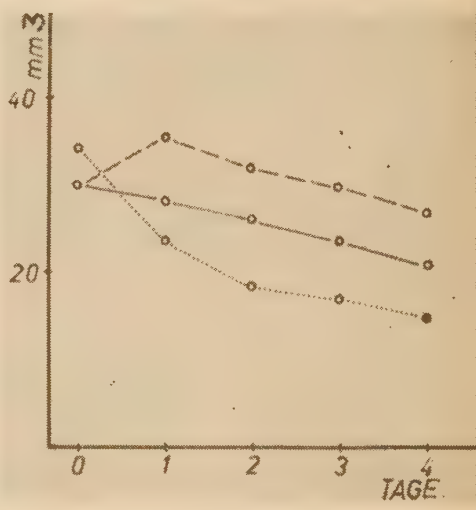


Fig. 4: Atmung von Digitalis-Blattscheiben, bei 24° in 12stündigem Licht-Dunkel-Wechsel gehalten. Infiltration wie bei Fig. 3. Ordinate und Abszisse s. Fig. 3. (o — o Inosit; o - - - o Glucose; o . . . . . o H_2O)

Die Darstellung der Atmungsintensitäten wird besonders deutlich, wenn man den jeweiligen Wert der Wasserkontrolle gleich Null definiert und auf der Ordinate die Differenz zwischen der Atmungsintensität der Inosit- bzw. Glucose-infiltrierten Blattscheiben und der Atmungsintensität der Wasserkontrolle aufträgt (Fig. 5):

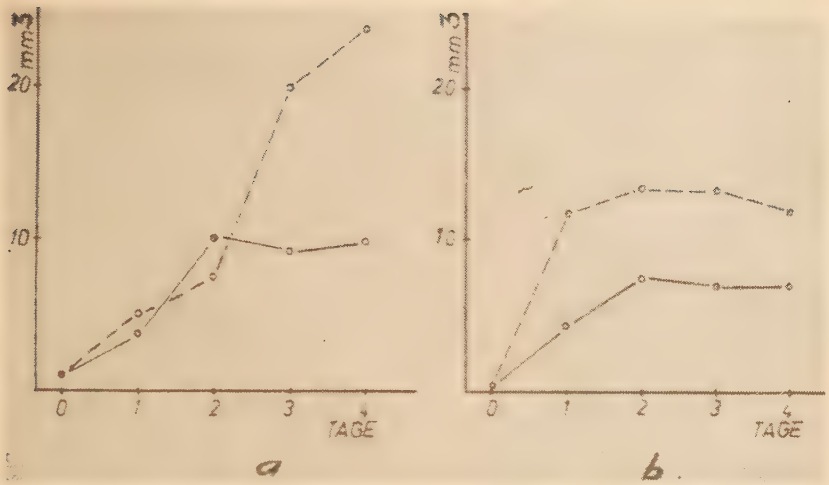


Fig. 5: Atmung von Digitalis-Blattscheiben, infiltriert mit 0,2 m Inosit und 0,2 m Glucose.
a) Blattscheiben im 12stündigen Licht-Dunkelwechsel.
b) Blattscheiben im Dauerdunkel.
Ordinate und Abszisse wie bei Fig. 3 (o — o Inosit; o - - - o Glucose)

Allgemein betrug die Erhöhung der Atmungsintensität nach Infiltration mit Inosit ungefähr 40 % der Atmungssteigerung nach Glucoseinfiltration. Der RQ schwankte zwischen 1.0 und 1.1, zeigte aber keine bestimmte Tendenz. Es war zu untersuchen, ob der zunächst bei *Digitalis purpurea* beobachteten Steigerung der Atmungsintensität nach Inositfiltration allgemeine Bedeutung zukommt, vor allem, ob sie auch bei Blättern zu beobachten ist, die ursprünglich keinen Inosit enthalten. Beispiele über die Wirkung von Inosit- und Zuckerinfiltration auf die Atmungsintensität der von uns untersuchten Pflanzenarten sind in Tab. 6 zusammengestellt.

Ein prinzipieller Unterschied zwischen inosithaltigen Pflanzen und solchen, in deren Extrakten sich kein freier Inosit nachweisen ließ, scheint nicht vorzuliegen. Die Versuche mit *Spinacia* und *Dracena* mußten nach 48 Stunden abgebrochen werden, da Bräunung der Blätter eine Schädigung anzeigte.

Auf Inosit wurde geprüft, indem 0,5 g Trockengewicht des entsprechenden Blattmaterials mit 50 cm^3 Wasser extrahiert, abzentrifugiert und im Vakuum auf 5 cm^3 eingeengt wurde. Von dieser Lösung wurden 0,01 cm^3, 0,05 cm^3, 0,1 cm^3 in Aceton-Butanol-Wasser chromatographiert und nach Besprühen mit ammoniakalischem Silbernitrat mit Testinosit verglichen.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß die beobachtete Atmungssteigerung auf einen osmotischen Effekt zurückzuführen sei, infiltrierten wir bei mehreren Versuchen neben Wasser noch eine 0,2 m Mannitlösung. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Krech[32] konnte bei Mannitinfiltration gegenüber Wasser keine Atmungssteigerung beobachtet werden.

Fläche cm²	Pflanzenart **inosithaltig:**	Vor der Infiltration I	G	W	1. Tag I	G	W
6	Digitalis purpurea	28,0	28,5	26,8	31,4	33,1	27,8
10	Parthenocissus quinquefolia	35,4	35,8	34,6	50,0	50,2	35,5
6	Spinacia oleracea	89,4	89,3	91,7	79,0	103,1	66,0
	inositfrei:						
6	Saxifraga crassifolia	53,0	50,0	53,0	67,0	68,8	56,0
6	Dracena spez. panaschiert	19,8	20,8	20,7	30,6	33,6	25,8

Tab. 6: mm^3 O_2-Aufnahme in Blattscheiben inosithaltiger und inositfreier Pflanzen nach Infiltration mit 0,2 m Inosit-, 0,2 m Glucose-Lösung und Wasser. Die Blattscheiben wurden in 12stündigem Licht-Dunkel-Wechsel gehalten.

Der durch die Atmungsintensivierung erbrachte indirekte Hinweis auf eine Verwendung des Inosits im Atmungsstoffwechsel erhielt durch die quantitative Bestimmung seiner Abnahme in infiltrierten Blattscheiben eine weitere Stütze.

Wie Fig. 6 und 7 zeigen, war schon 24 Stunden nach der Infiltration eine deutliche Abnahme des Inosits zu beobachten. Wie bei der Atmungssteigerung bestand auch bei der Abnahme des Inosits kein prinzipieller Unterschied zwischen inosithaltigen und inositfreien Pflanzen. Besonders rasch erfolgte der Abbau in *Spinacia oleracea*. Hier war schon nach 78 Stunden

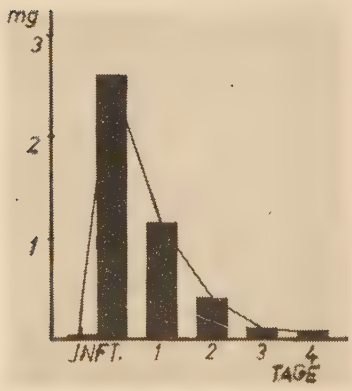


Fig. 6: Abnahme des in 20 Blattscheiben von *Spinacia oleracea* infiltrierten Inosits.

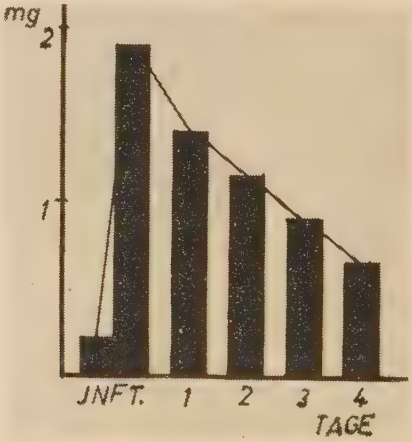


Fig. 7: Abnahme des in 30 Blattscheiben von *Phaseolus multiflorus* infiltrierten Inosits.

Fortsetzung von Tab. 6

Fläche cm²	Pflanzenart	2. Tag			3. Tag			4. Tag		
	inosithaltig:	I	G	W	I	G	W	I	G	W
6	Digitalis purpurea	36,0	33,3	25,9	31,8	43,7	24,1	32,7	48,3	24,1
10	Parthenocissus quinquefolia	48,5	60,1	32,0	50,4	50,7	32,0			
6	Spinacia oleracea	77,2	105,3	63,2						
	insitfrei:									
6	Saxifraga crassifolia	78,0	80,8	49,5	61,5	75,5	40,0	52,0	68,4	37,0
6	Dracena spez. panaschiert	32,6	41,5	15,8						

Fortsetzung von Tabelle 6

der zugefütterte Inosit verbraucht. Spinat nimmt unter den untersuchten Objekten auch insofern eine Sonderstellung ein, als allein bei ihm nach Infiltration mit Inosit neu entstehende Stoffe nachzuweisen waren.

In dem sonst noch daraufhin geprüften Material erfolgte die Abnahme langsamer (Fig. 7, Tab. 8), doch kaum weniger deutlich. Wurde an Stelle des Inosits eine 0.2 m Mannitlösung infiltriert, so war auch nach 5 Tagen keine Abnahme des Mannitgehaltes festzustellen (s. a. Abb. 2).

Über die qualitative Parallelität von Inositabnahme und gesteigerter Atmungsintensität hinaus konnte keine quantitative Beziehung zwischen Höhe der Atmungssteigerung und Geschwindigkeit des Inositabbaues gefunden werden.

Pflanzenart	γ Inosit					
	V	I	24h	48h	72h	96h
Spinacia oleracea	0,05	2,60	1,15	0,40	0,10	0,07
Phaseolus multifl.	0,20	1,90	1,45	1,15	0,90	0,75
Parthenocissus quinquefolius	0,30	2,40	1,40	1,05	0,90	0,65
Saxifraga crassifolia	0,00	2,20	1,95	1,70	1,40	1,20
Phaseolus multifl. unfiltriert 40 Blattscheiben	0,45		0,33	0,20	0,08	

Tab. 8: Abnahme des infiltrierten Inosits in verschiedenen Pflanzenarten. 12stündiger Licht-Dunkel-Wechsel bei 24 °.
Abnahme des natürlichen Inosits in Phaseolus multiflorus. Dauerdunkel bei 24 .
V = vor der Infiltration; I = nach Infiltration.

Eine sehr deutliche Abnahme des Inositgehaltes zeigten auch uninfiltrierte Blattscheiben von *Phaseolus multiflorus*, die im Dauerdunkel bei 24 ° gehalten wurden. Innerhalb von 72 Stunden sank der Inositgehalt auf 17 % seines ursprünglichen Wertes.

Für eine Wiedereinbeziehung natürlich vorkommenden Inosits sprechen Versuche, die wir an keimendem Weizen durchführten. In Gramineensamen findet sich Inosit ausschließlich als Calcium-Magnesiumsalz des Hexaphosphorsäureesters (Phytin). Während der Keimung wird Phytin durch ein besonderes Enzym, die Phytase, über verschiedene Zwischenstufen zu freiem Inosit abgebaut. Ahlbaum und Umbreit[23] stellten in den Weizenkeimlingen den Verlauf der Phytinabnahme fest und fanden, daß der Phytinanteil am Gesamtphosphat der Keimlinge im Zeitraum von 5 Tagen von 78 % auf 5 % absinkt. Würde Inosit nur schwer in den Stoffwechsel wieder einbezogen, so müßte sich vom 3. bis 5. Tag der Keimung, wenn die Kurve des Phytinanteils ihren steilsten Abfall zeigt, eine Zunahme des Gehaltes an freiem Inosit nachweisen lassen.

Weizenkörner wurden in Leitungswasser 3 Stunden vorgequollen und in Konservengläsern auf feuchtem Filtrierpapier zum Auskeimen gebracht. Jeden Tag wurden 25 Keimlinge entnommen, kurz auf 110° erhitzt und bei 60° getrocknet. Anschließend wurde mit 2 mal 50 cm³ Wasser extrahiert, abzentrifugiert und die Lösung wie oben beschrieben über Kohle-Celit vorgereinigt. Bei der anschließenden Papierchromatographie erwiesen sich auftretende Stärkeabbauprodukte als störend. Durch zweimalige papierchromatographische Trennung ließ sich diese Schwierigkeit beseitigen. Dazu wurde der in einem Streifen aufgetragene Extrakt zuerst mit Aceton-Butanol:Wasser aufgetrennt, der dem Rf-Wert des Inosits entsprechende Anteil ausgeschnitten und in Wasser extrahiert, darauf erneut im Vakuum eingeengt und mit 1,0 cm³ Wasser aufgenommen. Von dieser Lösung aus den einzelnen Ansätzen wurden nebeneinander Startpunkte mit 0,1 cm³ aufgetragen und zusammen mit Testinosit 48 Stunden mit Butanol:Eisessig:Wasser (40:10:50) chromatographiert.

Nach Besprühen mit ammoniakalischer Silbernitratlösung und Erhitzen zeigte sich in allen Keimungsstadien nur ein sehr schwacher Fleck mit dem Rf-Wert des Inosits (0,09). Das erwartete Maximum nach 72 bis 120 Stunden konnte nicht beobachtet werden. Dagegen traten deutliche Flecken mit einem Rf-Wert 0,07 auf, die einem Stärkeabbauprodukt zugehören müssen. Diese Substanz zeigte ein deutliches Maximum: im 1. Versuch nach 120 Stunden, im 2. Versuch nach 72 Stunden Keimdauer. Da der Rf-Wert dieses Stoffes im Acetongemisch sehr nahe bei dem des Inosits liegt, ist die Gefahr einer Fehldeutung sehr groß und kann nur durch zweimalige Papierchromatographie umgangen werden. Nur bei der Aufarbeitung von Gramineenkeimlingen erwies sich die Kohle-Celitreinigung als nicht ausreichend für eine quantitative Bestimmungsmethode.

Es scheint also, daß Phytin in Ceraliensamen nicht nur eine Phosphat- und Erdalkalireserve darstellt, sondern daß auch der Inositanteil bei der Keimung Verwendung findet. Dieser Befund steht in Widerspruch zu einer Angabe von Burkholder[34], der bei der Keimung von Weizen eine Inositzunahme von 1,46 mg auf 2,1 mg g Trockengewicht feststellte. Allerdings erfolgte diese Zunahme bei Keimung im Licht. Gegen die Wahl des Trockengewichtes als Bezugseinheit können in diesem Fall starke Bedenken vorgebracht werden. Auch wurden diese Werte durch Biotest erhalten und es besteht die Möglichkeit, daß auch die während der Phytinhydrolyse entstehenden nieder phosphorilierten Inositderivate in zunehmendem Maße das Wachtum der Testorganismen stimulieren können.

Scheinen sowohl die Versuche mit infiltriertem Inosit, wie auch die Abnahme des natürlichen Inosits in *Phaseolus* einen Hinweis auf seine leichte Mobilisierbarkeit zu geben, so lassen Beobachtungen an *Juglans nigra* den gegenteiligen Schluß zu. Diese Blätter zeichnen sich durch einen hohen Inositgehalt aus, der durchschnittlich 0,7 % des Frischgewichtes beträgt. Sie schienen daher zunächst für unsere Versuche besonders gut geeignet. Wurden jedoch Blattscheiben aus diesem Material getrennt im Dunkeln und im Dauerlicht bei 24 ° gehalten, so konte auch nach Tagen kein Unterschied im Inositgehalt beider Ansätze beobachtet werden. In beiden Ansätzen fand über 5 Tage keine Abnahme des Inosits statt (Tab. 9):

	mg Inosit					
Tage	0	1	2	3	4	5
Dauerlicht	2,5	2,7	2,7	2,4	2,5	2,6
Dunkel	2,4	2,7	2,8	2,6	2,6	2,5

Tab. 9: Inositgehalt in 10 Blattscheiben von Juglans nigra im Dauerlicht und im Dunkeln bei 24 °.

Auch Infiltration mit 0,1 m Saccharoselösung führte zu keiner Änderung des Inositgehaltes. Da diese Infiltrationsversuche jedoch im Sommer — also mit schon lange ausdifferenziertem Blattmaterial — vorgenommen wurden, müßte man auch einmal an jungen Blättern untersucht werden, ob an ihnen durch Zuckerfütterung eine Synthesetätigkeit anzuregen ist.

II. Zwischenprodukte des Inositabbaues

Der rasche Abbau des infiltrierten Inosits bei allen untersuchten Objekten legte nahe, zu untersuchen, ob im Verlauf dieses Abbaus sich irgendwelche Zwischenstufen beobachten oder gar abfangen lassen. Zu diesem Zweck wurden die obigen Abbauversuche wiederholt, diesmal aber steigende Mengen des Rohextraktes papierchromatographisch aufgetrennt. Nach Entwickeln in Aceton:Butanol:Wasser wurden die Chromatogramme zunächst unter der UV-Lampe auf neu auftretende fluoreszierende Substanzen untersucht. Bei einer Aromatisierung des zugefütterten Inosits hätte man ein solches Neuauftreten fluoreszierender Verbindungen oder doch wenigstens eine deutliche Zunahme der vorhandenen fluoreszierenden Stoffe erwarten dürfen. Bei keinem der untersuchten Objekte ließen sich sichtbare Unterschiede feststellen. Neue fluoreszierende Substanzen traten nie auf.

Anschließend wurden die Chromatogramme mit ammoniakalischem Silbernitrat besprüht und auf 105 ° erhitzt, um Änderungen in der Zusammensetzung der reduzierenden Stoffe zu erfassen. In fast allen Fällen konnte neben der deutlichen Inositabnahme eine gleichzeitige Abnahme der Monosen beobachtet werden. Bei *Phaseolus multiflorus* trat in einigen Fällen nach 24 bzw. 48 Stunden eine Zunahme der Glucose auf. Da diese Blätter aber sehr viel Stärke enthielten, muß diese Zuckerzunahme wahrscheinlich auf Mobilisierung der Stärke zurückgeführt werden. Ein direkter

Zusammenhang mit der Inositinfiltration ist unwahrscheinlich. Der Beweis für einen solchen wäre ohne Anwendung markierten Materials auch sehr schwer zu führen. Daher wurde von einer genaueren Untersuchung dieses Phänomens abgesehen.

Im Gegensatz dazu konnte nach Infiltration von *Spinacia*-Blattscheiben eindeutig das Auftreten einer neuen reduzierenden Substanz beobachtet werden. Abb. 1 zeigt, wie zunächst der gleichmäßigen Abnahme des infiltrierten Inosits die Zunahme einer reduzierenden Substanz mit niederem Rf-Wert parallel geht. Am 2. oder 3. Tag durchlief die Menge der neugebildeten Substanz ein Maximum, um daraufhin wieder abzunehmen. Während dieser Abnahme konnte in den meisten Fällen beobachtet werden, daß weitere reduzierende Flecken auftraten, doch waren diese von weit geringerer Intensität.

Abb. 1: Inositabnahme und Auftreten eines Umsetzungsproduktes in Blattscheiben von *Spinacia oleracea*.
Rechts Vergleichsinosit. (Bespruht mit ammoniakalischem Silbernitrat).

Zunächst mußte mit Sicherheit geklärt werden, ob die neu auftretende Substanz in direktem Zusammenhang mit der Inositinfiltration stand und ob es sich nicht um ein Zersetzungsprodukt handelte, das unter den unphysiologischen Bedingungen aus blatteigenem Material entstand.

Dazu wurden je 20 miteinander vergleichbare Blattscheiben mit 0,2 m Lösungen von Inosit, Glucose und Mannit und mit Wasser infiltriert. Nach Ausdunsten des Lösungsmittels wurden die Blattscheiben 72 Stunden in feuchten Kammern bei 24° gehalten. Die Rohextrakte dieser Ansätze wurden auf 5 cm³ eingeengt und von diesen Lösungen 0,05 cm³ zur papierchromatographischen Trennung aufgetragen. Das Ergebnis zeigt Abb. 2:

Abb. 2: Infiltration von 0,2 m Inosit-, Glucose- und Mannitlösung und Wasser in Blattscheiben von *Spinacia oleracea*.
V. l. n. r.: Inosit, Glucose, Testinosit, Mannit, Wasser.

Eine neue reduzierende Substanz tritt nur nach Infiltration mit Inosit auf; ihr Entstehen kann also nicht einer allgemeinen Schädigung der Blattscheiben durch die Infiltration zugeschrieben werden. Die zugefütterte Glucose ist schon vollständig verbraucht, ohne daß gegenüber der Wasserkontrolle Änderungen eingetreten wären. Der zugefütterte Mannit wurde nicht angegriffen.

Unterschiede zwischen jungen und alten Blättern, wie auch zwischen solchen, die nach der Infiltration im Dunkel oder im Licht gehalten wurden, waren nur quantitativ. Immer trat parallel der Inositabnahme das angeführte Umbauprodukt auf.

Wir versuchten zunächst, durch Anwendung verschiedener Sprüh-Reagentien Anhaltspunkte für den chemischen Charakter dieses Inositumbauproduktes zu erhalten. Alle beim mikrobiologischen Abbau des Inosits auftretenden Mono- und Diketone zeichnen sich im Aceton:Wassergemisch gegenüber Inosit durch hohe Rf-Werte aus (Posternak u. Mitarb.)[35]. Es schien daher unwahrscheinlich, daß die in Spinat auftretende Substanz mit den Zwischenprodukten des Abbaus durch Mikroorganismen identisch sei. Darüber hinaus konnten wir weder mit den von Posternak u. Mitarbeiter[35] angegebenen Reagentien auf Inososen, noch mit allgemeinen Sprühreagentien auf Ketoverbindungen einen positiven Nachweis führen. Der Test auf Cyclite nach Scherer-Gallois in seiner Abänderung als Sprühreagens für Papierchromatographie nach Fleury u. Mitarb.[29] verlief ebenfalls negativ.

Es scheint also, daß beim Abbau des Inosits in Spinatblättern schon früh eine Ringsprengung einsetzt.

Der gegenüber Inosit erniedrigte Rf-Wert der Substanz in Aceton:Butanol:Wasser (0,14—0,16) könnte auf einer Steigerung der Wasserlöslichkeit oder einer Verminderung der Löslichkeit in Aceton gegenüber Inosit bestehen. Eine solche wäre möglich durch Glycosidierung oder Phosphorylierung der alkoholischen Hydroxyle oder durch Auftreten einer Säuregruppe nach oxydativer Ringsprengung. Sämtliche Tests auf eine Säuregruppe verliefen aber negativ, ebenso Sprühreaktionen auf Phosphat. Der Nachweis wurde dadurch erschwert, daß im Extrakt anorganische und organische Phosphate in hoher Konzentration vorhanden sind, die teilweise einen der neu entstandenen Substanz ähnlichen Rf-Wert haben. Es gelang uns, durch Zusatz von 1 cm^3 Eisessig pro 100 cm^3 Lösungsmittelgemisch im Papierchromatogramm eine genügend scharfe Trennung zu erhalten, so daß ein eindeutig negativer Test auf Phosphat an der Silbernitrat reduzierender Stelle möglich war. Nach chromatographischer Trennung und Elution gelang es uns ferner, einen Extrakt zu erhalten, der bei erneuter Auftrennung Silbernitrat reduzierte, jedoch keine Phosphatreaktion mehr ergab.

Zur Kontrolle auf glycosidische Bindung versuchten wir zunächst eine enzymatische Spaltung mit Emulsin in einem Sprühverfahren, wie es von Eberhardt[36] zur Spaltung von Scopoletin verwendet worden war. Bei dieser Methode, wie auch bei einem Ansatz in vitro, der 18 Stunden bei 37° im Thermostaten gehalten worden war, konnte kein Nachweis auf eine glycosidische Bindung erbracht werden. Wurde ein durch Papierchromatographie und anschließende Elution vorgereinigter Extrakt einer sauren Hydrolyse unterzogen, so traten zwei neue Flecken mit Rf-Wert 0,35 und 0,43 auf. Keine dieser Substanzen gab jedoch mit Phtalanilid die für Zucker typische Reaktion.

Die Hydrolyse erfolgte durch Kochen der aus dem Chromatogramm eluierten Substanz mit 80%iger Ameisensäure im Rückfluß. Nach der Hydrolyse wurde die Säure im Vakuum abgedampft, dann so lange mit Wasser aufgenommen und erneut eingeengt, bis die Lösung keine saure Reaktion mehr zeigte. Dann wurde erneut aufgetragen und chromatographiert.

Zusammen mit dem negativen Verlauf der Scherer-Gallois-Tests scheint also ziemlich sicher, daß es sich bei der beobachteten Substanz nicht um Inositglycosid handelt. Der Verdacht auf die Bildung eines solchen lag nahe, da in letzter Zeit in den Phosphatfraktionen verschiedener Pflanzen häufig Inositglycoside, vor allem Galaktoside gefunden wurde.

Eine genaue Identifizierung des neu entstandenen Stoffes wäre nur nach chemischer Isolierung und Kristallisation möglich. Wir versuchten eine solche ohne Erfolg nach Infiltration und Aufarbeitung einer größeren Menge Ausgangsmaterials.

500 g Spinatblätter wurden mit 0.2 m Inositlösung infiltriert und in feuchten Kammern bei 24° 60 Stunden im Dunkeln gehalten, anschließend bei 60° getrocknet und mit insgesamt 600 cm³ Wasser extrahiert. Nach Abzentrifugieren wurde im Vakuum auf 30 cm³ eingeengt und über eine Säule (5 cm, Länge 35 cm), die mit Cellulosepulver (Schleicher-Schüll 123) beschickt war, chromatographiert. Das Lösungsmittel (Aceton:Butanol:Wasser) wurde in Fraktionen zu 250 cm³ aufgefangen, eingeengt und mittels Rundfilterchromatographie laufend auf reduzierende Substanzen untersucht. Das gesuchte Umbauprodukt fand sich im Eluat 18 bis 21, doch war es noch von so viel Stoffen ähnlichen Rf-Wertes verunreinigt, daß eine Kristallisation mißlang. Diese Versuche wurden dadurch erschwert, daß die zu isolierende Substanz sich als instabil erwies.

Ebenso negativ verlief ein weiterer Isolierungsversuch, bei dem wir an Stelle einer Cellulosesäule eine Reinigung durch präparative Papierchromatographie anstrebten. Zu diesem Zweck trugen wir den Extrakt aus 500 g infiltriertem Spinat auf 60 Streifen Chromatographierpapier (Schleicher-Schüll 2043 b Mgl, mit dest. Wasser gewaschen) auf und versuchten, die Substanz, deren Lage in den einzelnen Chromatogrammen durch Besprühen von Teststreifen ermittelt worden war, zu eluieren und zur Kristallisation zu bringen. Auch dabei erhielten wir sie nicht frei von Begleitstoffen. Zwar konnten beim Einengen des Papiereluats ungefähr 3 mg kristallisierte Substanz erhalten werden; bei Untersuchung im polarisierten Licht und bei Prüfung des papierchromatographischen Verhaltens ergab sich jedoch, daß die Substanz nicht einheitlich war. Auch hier scheiterte eine weitere Reinigung nicht zuletzt an der Instabilität des gesuchten Stoffes.

Ein Ansatz mit Pulver gefriergetrockneter Spinatblätter, dem in Phosphat- und Acetatpuffer 0.2 m Inositlösung zugesetzt wurde, zeigte weder einen Atmungsanstieg, noch bei papierchromatographischer Auftrennug das Auftreten des gesuchten Umbauproduktes. Da die Ausarbeitung einer Isolierungsmethode über den Rahmen dieser Arbeit hinausging, wurde vorläufig auf eine weitere Untersuchung dieses Zwischenproduktes verzichtet.

III. Inositinfiltration und Eiweißsynthese

Der bei unseren Versuchen nach Inositinfiltration beobachtete Atmungsanstieg bei gleichzeitiger Inositabnahme läßt vermuten, daß Inosit in höheren Pflanzen als Substrat für die Atmung dienen kann. Da es uns nicht gelang, ein Zwischenprodukt dieses Abbaus zu isolieren, bleibt immer noch offen, ob die beobachtete Inositabnahme auf einem Einbau des intakten Moleküls in eine wasserunlösliche Verbindung beruhte. Der beobachtete

Atmungsanstieg wäre dann nur ein Zeichen des Energiebedarfs dieses Umbaus und ginge auf Kosten der Reservestoffe. Wir versuchten daher indirekt zu beweisen, daß Inosit in den Primärstoffwechsel einbezogen wird, indem wir untersuchten, ob ähnlich der Zuckerfütterung die Inlfiltration mit Inosit eine Steigerung der Synthesetätigkeit hervorruft. Schon mehrmals ist der Einfluß der Zuckerfütterung auf die Eiweißsynthese untersucht worden (Mothes[37], Paech[39]). Dabei wurde beobachtet, daß in verdunkelten Blättern der Proteinumsatz durch die Menge der vorhandenen Kohlenhydrate beeinflußt wird. Es gelang, den niederen relativen Eiweißwert, der für Hungerzustände typisch ist, durch Fütterung mit Zuckern zugunsten des unlöslichen Stickstoffes zu verschieben oder wenigstens eine weitere Zunahme des löslichen Stickstoffes zu verhindern.

Auch war es gelungen, in panaschierten Blättern den niederen Anteil des Eiweißstickstoffes am Gesamtstickstoff durch genügend hohe Zuckerfütterung heraufzusetzen (Schumacher[39]; Paech[40]). Es galt, zu untersuchen, ob bei Fütterung mit Inosit eine Wirkung zu erzielen war, die der nach Zuckerinfiltration entspricht.

Primärblätter von *Phaseolus multiflorus* wurden entlang der Mittelrippe halbiert und zunächst in beiden Blatthälften der Anteil an löslichem und unlöslichem Stickstoff bestimmt. Die Methode ist bei Paech[38] ausführlich beschrieben. Das Verhältnis des löslichen zum unlöslichen Stickstoff war in diesen Vorversuchen in beiden Blatthälften immer gleich.

Für die Untersuchungen mit Inosit wurde die eine Blatthälfte mit Wasser, die andere mit 0,2 m Lösung von Inosit bzw. Glucose infiltriert, nach Ausdunsten des Lösungsmittels mit der Blattoberseite nach unten auf die entsprechende Lösung bzw. auf Wasser gelegt und ins Dauerdunkel bei 24° gestellt. Um Verpilzung zu vermeiden, wurden die Lösungen jeden Tag gewechselt und die Blatthälften mit destilliertem Wasser abgespült. Die Versuchsmethode mit panaschierten Blättern entsprach derjenigen mit *Phaseolus*.

Die Ergebnisse des Versuchs zeigt Tabelle 10. Die angegebenen Zahlenwerte sind Mittel aus fünf bis zehn Bestimmungen.

Material	Eiweiß in % Gesamt-N		
	W	G	I
Phaseolus multiflorus	63,7	69,3	
Primärblätter	66,4		67,3
5 Tage dunkel, 24°			
Phaseolus multiflorus	40,5	48,9	
etioliert	40,0		41,3
3 Tage dunkel, 24°			
Begonia weiße T.	54,0		53,2
3 Tage dunkel	53,5	68,1	
Begonia grüne T.			
5 Tage dunkel	73,5		74,0

Tab. 10: Anteil des Eiweißstickstoffes am Gesamtstickstoff nach Infiltration von 0,2 m Glucose- bzw. Inositlösung.

Bei den mit Glucose gefütterten Blatthälften ist eine deutliche Zunahme des Eiweißstickstoffes gegenüber der Wasserkontrolle zu beobachten. Bei den inositinfiltrierten Phaseolusblättern scheint eine schwache Zunahme vorzuliegen, doch liegt der erzielte Unterschied von durchschnittlich 1% noch im Bereich des Fehlers der Bestimmungsmethode. Durch Variation des Materials oder seiner Vorbehandlung wie auch durch Änderung in der Konzentration der Lösungsmittel ließen sich keine größeren Effekte erzielen.

Bei panaschierten Blättern war keine Zunahme zu verzeichnen. Die erhaltenen Werte lassen eine Aussage über die Einbeziehung des Inosits in den Stoffwechsel nicht zu.

IV. Inositinfiltration und Anthocyansynthese

Bei *Spirodela* konnte eine leichte Förderung der Anthocyansynthese durch Inositfütterung erzielt werden (Thimann u. Edmonson[11]; Thimann u. Mitarb.[12]). Wir selbst konnten diese Beobachtung auch bei unseren Versuchen mit *Saxifraga crassifolia* und an *Hedera helix* bestätigen. Der Steigerung der Anthocyansynthese nach Inositinfiltration scheint allgemeinere Bedeutung zuzukommen. Allerdings lagen auch bei unseren Objekten die Synthesewerte weit unter denen nach Glucosefütterung (Tab. 11).

Material	W	I	G
Saxifraga crassifolia	0,031	0,09	0,86
Hedera helix	0,01	0,06	0,42

Tab. 11: Extinktion aus 20 Blattscheiben, infiltriert mit 0,2 m Inosit- bzw. Glucoselösung. Vier Tage Dauerlicht bei 24°.

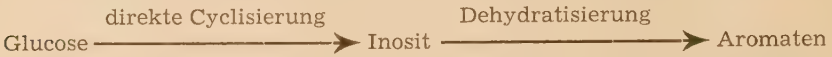
Zur Bestimmung der Extinktion wurden Blattscheiben mit Veibel'scher Lösung (6,71 g KCl auf 1 ln 100 HCl) extrahiert und das Anthocyan in 10 cm³ Butanol aufgenommen. Die butanolische Lösung wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und die Extinktion in 1-cm-Küvetten im Spektralphotometer (Zeiss-Opton) bei einer Wellenlänge von 5300 Å gemessen.

Das Verhältnis des nach Inositinfiltration neu gebildeten Anthocyans zu dem nach Glucosefütterung neu entstandenen entspricht nicht dem Verhältnis der Atmungssteigerungen nach Inosit- und Glucoseinfiltration. Die Atmungssteigerung nach Inositinfiltration betrug bei *Saxifraga crassifolia* 70% der Atmungssteigerung nach Zuckerfütterung, die Steigerung der Anthocyansynthese dagegen nur 7%.

Wurde in Blattscheiben gleichzeitig 0,1 m Glucose- und 0,1 m Inositlösung infiltriert, so entsprach die Anthocyansynthese der Neubildung nach Infiltration mit 0,1 m Glucoselösung allein. Es hätte aber eine Steigerung erwartet werden müssen, wenn das Inositmolekül im Sinne von Moewus[13] direkt in das Anthocyanmolekül eingebaut und die leichte Steigerung der Anthocyansynthese nach Inositinfiltration auf einer Verwendung des intakten Inositringes beruhen würde.

D) Diskussion

Theoretische Überlegungen, die durch die Arbeiten von Kursanow[26, 27] und Fernandez und Mitarb.[28] eine experimentelle Stütze erhielten, führten zu folgendem Schema über die Stellung des Inosits im Stoffwechsel:



Diese Vorstellung bildete auch den Ausgangspunkt zu unseren eigenen Untersuchungen.

Die oben angeführten Tierversuche zur Biosynthese des Inosits konnten wohl einen Zusammenhang zwischen Glucose und Inosit aufzeigen. Da aber bei Isotopenversuchen die im Inositanteil wiedergefundene Aktivität durchschnittlich nur 0,01% der Aktivität der zugefütterten Glucose betrug, war durchaus keine Beweis für die direkte Cyclisierung gegeben. Die Möglichkeit einer Synthese aus Glucosebruchstücken blieb weiterhin offen. Daß Kursanow[26, 27] nach Fütterung von Glycerinaldehyd, Glycollaldehyd, Glycerin und Brenztraubensäure keine Inositsynthese feststellen konnte, beweist nichts, da bekanntlich nur die energiereicheren Phosphate dieser Verbindungen im Synthesestoffwechsel von Bedeutung sind. Auch blieb die Intrabilität dieser Substanzen unkontrolliert.

Den einzigen Beweis für eine Cyclisierung bildete die von Fernandez u. Mitarb.[28] in *Lactuca virosa* beobachtete „Cyclase". Energetisch ist eine solche Umsetzung möglich, wie ein Vergleich der Verbrennungswärmen (Glucose 674 Kal., Inosit 663 Kal.) zeigt. Dabei bleibt aber noch offen, ob eine solche Ringbildung etwa Zwischenstufen mit erheblich höherem Energiegehalt durchlaufen muß, die nicht ohne Mitwirkung energiereicher Verbindungen (ATP, ITP) gebildet werden können.

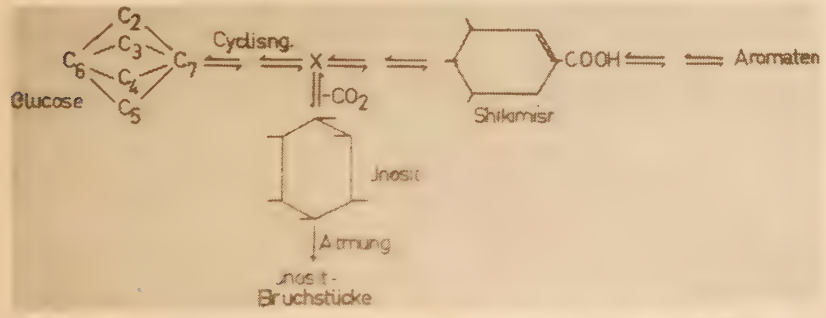
Die bei *Lactuca virosa* beschriebene Cyclase steht in der Literatur vollkommen isoliert. Ein Aldosen cyclisierendes Enzym konnte bis heute aus keinem anderen Material isoliert werden. — Die neuerdings von Mann und Smithies[44] beobachtete *spontane* Ringbildung aus Aldiminen, die bei der Oxydation von Diaminen mit pflanzlichen Aminoxydasen entstehen, kann nicht mit der Cyclisierung von Aldosen verglichen werden. Bei der weittragenden Bedeutung einer solchen Reaktion schien es uns gerechtfertigt, die von Fernandez u. Mitarb.[28] mit einem sehr groben Test durchgeführten Versuche an *Lactuca virosa* mit spezifischeren Methoden zu reproduzieren. Da diese Versuche durchaus negativ verliefen, muß die Frage einer direkten Cyclisierung der Glucose zu Inosit als noch offen betrachtet werden. Dies umsomehr, nachdem wir bei Infiltration von Zuckern in *Phaseolus multiflorus* und *Juglans nigra* keinen Anstieg des Inositgehaltes beobachten konnten. Die von Kursanow[26, 27] in Teeblättern nach Zuckerfütterung beobachtete rasche Zunahme des Inositgehaltes innerhalb von 2 Stunden um 20 bis 40% scheint demnach nicht allgemein verbreitet zu sein. Die hohe Umsetzungsrate in diesem Material macht es

jedoch besonders geeignet, durch Fütterung markierter Glucose und anschließende spezifische chemische Aufspaltung des gebildeten Inosits (Orloff[15]) einer Aufklärung seiner Biosynthese etwas näherzukommen.

Für die Synthese der Shikimisäure, die immer wieder mit dem Inositstoffwechsel in Verbindung gebracht wurde, konnte mit Hilfe der Isotopenmethode wahrscheinlich gemacht werden, daß nicht Glucose selbst, sondern C_3- und C_1-Bruchstücke derselben für die Ringsynthese verwendet werden.

Ehrensvärd[16] nimmt eine Cyclisierung von C_7- oder C_8-Körpern als Vorstufen der Shikimisäure an. Für Shikimisäure konnte bei Mikroorganismen bewiesen werden, daß sie ein Glied in der Reaktionskette zur Bildung aromatischer Aminosäuren darstellt. Da entsprechende Enzyme dieses Syntheseweges auch aus höheren Pflanzen isoliert werden konnten, ist wahrscheinlich, daß diesem Weg der Aromatensynthese allgemeine Bedeutung zukommt.

Hält man am Zusammenhang des Inositstoffwechsels mit der Biosynthese der aromatischen Verbindungen und an seiner stoffwechselphysiologischen Beziehung zur Shikimisäure fest, so bietet sich ein neues Schema für die Stellung des Inosits im Stoffwechsel an. Dieses Schema erlaubt — im Gegensatz zum oben angeführten — die sich teilweise widersprechenden Beobachtungen zum Stoffwechsel des Inosits durch einfache Gleichgewichtsverschiebungen zu interpretieren.

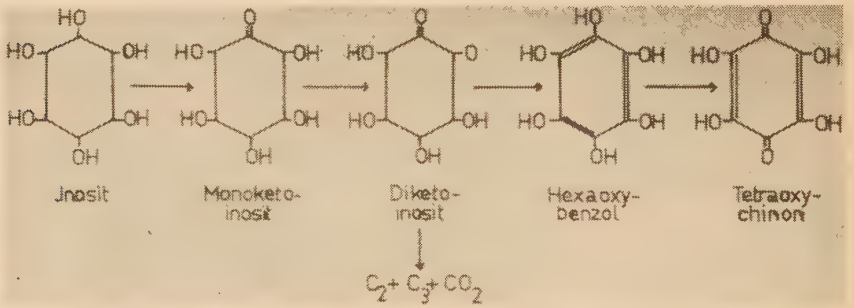


Die Inositbildung würde dann einen Seitenzweig einer allgemein verbreiteten Reaktionskette darstellen, aus der sie durch reversible Abspaltung der Seitenkette hervorgeht. Unsere Beobachtungen machen wahrscheinlich, daß in den meisten Fällen der Inositabbau unter Atmungsintensivierung die bevorzugte Reaktion ist und die Zunahme aromatischer Verbindungen nach Inositinfiltration einen Sonderfall darstellt. Solange es nicht gelingt, Zwischenprodukte dieses Abbaus zu isolieren oder durch geeignete Fraktionierung wirksame Enzympräparate zu erhalten, können nur Vermutungen über den Verlauf der Ringsprengung geäußert werden. Daß in unseren Chromatogrammen nach Inositinfiltration nie Inososen nachzuweisen waren, und daß die bei Spinat auftretende neue Substanz keine gemeinsamen Eigenschaften mit diesen Zwischenprodukten des Abbaus durch Mikroorganismen zeigt, stellt noch keinen Beweis für einen grundsätzlich anderen Verlauf in höheren Pflanzen dar.

Ist die Kapazität dieser abbauenden Enzyme gering, oder fallen sie ganz aus, so kommt es zu einer Anhäufung des gebildeten Inosits, wie das bei *Juglans nigra* der Fall ist. Ist gleichzeitig die Rückreaktion zum Syntheseweg der Shikimisäure begünstigt, so kann es nach Inositinfiltration zu der von K u r s a n o w bei Teeblättern beobachteten Zunahme der phenolischen Substanzen kommen.

Durch dieses Reaktionsschema wird gleichzeitig die Annahme einer Aromatisierung des Inositmoleküls durch Wasserabspaltung überflüssig. Für eine solche Reaktion konnten bis heute noch keine Beweise erbracht werden. Zwischenstufen dieser Dehydratisierung, wie sie beim Weg über Shikimisäure schon lange bekannt sind, wurden bis heute noch nicht gefunden.

Die Bildung von Tetraoxychinon aus Inosit durch *Pseudomonas* Beijerinkii (K l u y v e r u. Mitarb.[47]) stellt sicher einen Sonderfall des allgemeinen Abbaus durch Mikroorganismen dar.



In diesem Fall scheinen die für die Ringsprengung verantwortlichen Enzyme auszufallen. Durch weitere Dehydrierung der als Zwischenprodukt anfallenden Diketoverbindung entstehen dann die genannten aromatischen Ringe.

Auch der Zusammenhang zwischen Inosit und Synthese der aromatischen Verbindungen kann sicher erst mit Hilfe markierter Substanzen geklärt werden. Einen geeigneten Ausgangspunkt für derartige Untersuchungen könnte die von uns erneut beobachtete Steigerung des Anthocyangehaltes nach Iositinfiltration darstellen.

Zusammenfassung

1. Eine chemische quantitative Bestimmungsmethode für m-Inosit in pflanzlichem Material wurde ausgearbeitet.
2. Versuche, die Ergebnisse von Fernandez u. Mitarb. über das Vorkommen einer Cyclase in *Lactuca virosa* mit spezifischeren Methoden zu reproduzieren, verliefen negativ.
3. In *Phaseolus multiflorus* und *Juglans nigra* konnte durch Zuckerinfiltration keine Steigerung des Inositgehaltes erzielt werden.
4. Nach Infiltration mit Inosit trat bei allen untersuchten Objekten eine deutliche Intensivierung der Atmung auf. Die erzielte Atmungssteigerung betrug durchschnittlich 40 % der Atmungssteigerung nach Glucoseinfiltration. Dieser Atmungsintensivierung parallel erfolgt eine rasche Abnahme des infiltrierten Inosits.
5. Eine merkliche Zunahme der aromatischen Verbindungen nach der Inositinfiltration konte nicht festgestellt werden.
6. Bei *Spinacea oleracea* trat beim Inositabbau eine neue reduzierende Substanz auf. Versuche zur Indentifizierung dieser Verbindung schlugen fehl.
7. Die Inositinfiltration hatte keinen Einfluß auf die Eiweißsynthese.
8. Nach Infiltration von Inosit in *Saxifraga crassifolia* und in *Hedera helix* konnte eine deutliche Zunahme des Anthocyangehaltes beobachtet werden. Der Synthesewert erreichte jedoch nur 7 % der Synthesesteigerung nach Zuckerfütterung.

Literaturverzeichnis

1 Scherer, J. v.: Liebigs Ann. 73, 322, 1850.
2 Vohl, H.: Liebigs Ann. 99, 125, 1856.
3 Klein, G.: Handbuch der Pflanzenanalyse. Wien 1931 33. Bd. II, S. 254.
4 Czapek, F.: Biochemie der Pflanzen. 2. Aufl. Jena 1920/21.
5 Paech, K.: Sekundäre Pflanzenstoffe. Berlin 1950. S. 14.
6 Böhm, P. und G. Richarz: Anal. Chem. 298, 110, 1954.
7 Striebel, I.: Zulassungsarbeit zum Staatsexamen 1949, unveröff.
8 Scherer, J. v.: Liebigs Ann. 81, 375, 1885.
9 Gallois, M.: Zeitschr. analyt. Chem. 4, 264, 1865.
10 Williams, K. T., E. F. Potter, A. Bevenue und W. R. Scurzi: J. Assoc. Off. Agric. Chem. Wash. 32, 698, 1949.

11 Whistler, R. L. und D. F. Durso: J. Americ. Chem. Soc. 72, 677, 1950.
12 Tiselius, A.: Kolloid Zeitschr. 105, 101, 1943.
13 Fleury, P. und Lange: J. Pharm. Chim. 17, 313, 1937.
14 Fleury, P. und M. Joly: J. Pharm. Chim. 26, 341, 1937.
15 Fleury, P. und P. Balatre: Les Inositols. Paris 1947.
16 Platt, B. S. und G. E. Glock: Biochem. J. 37, 709, 1943.
17 Kortüm, G.: Kolorimetrie, Photometrie, Spektrometrie. Berlin 1955, S. 254.
18 Dangschat, G.: Naturwiss. 30, 146, 1942.
19 Posternak, Th.: Helv. Chim. Act. 25, 746, 1942.
20 Needam, J.: Biochem. J. 18, 1371, 1924.
21 Snell, E. E. und E. Quarless: J. Nutration 22, 483, 1941.
22 Daughaday, W. H. und Mitarb.: J. Biol. Chem. 212, 869, 1955.
23 Halliday, J. und L. Anderson: J. Biol. Cem. 217, 797, 1955.
24 Greenwald, I. und M. L. Weiss: J. Biol. Chem. 31, 1, 1917.
25 Stetten, M. R. und D. R. Stetten: J. Biol. Chem. 164, 85, 1946.
26 Kursanow, A. L.: Biochimia 13, 530, 1949.
27 Kursanow, A. L.: Docl. Acad. Nauk. USSR. LXVIII, 893, 1949.
28 Ferandez, O. und Mitarb.: Farmacia nueva 93, 563, 1944.
29 Fleury, P. und Mitarb.: Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 537, 1953.
30 Magasanik, B.: J Biol. Chem. 205, 1007, 1019, 1953.
31 Eberhardt, F.: Planta 43, 253, 1954.
32 Krech, E.: Beitr. z. Biol. d. Pflanzen 30, 379, 1954.
33 Ahlbaum, H. G. und W. W. Umbreit: Am. J. Bot. 30, 553, 1943.
34 Burkholder, P.: Science 97, 56, 1943.
35 Posternak, Th. und Mitarb.: Helv. Chem. Acta 38, 191, 1955.
36 Eberhardt, F.: Zeitschr. f. Bot. 43, 405, 1955.
37 Mothes, K.: Planta 1, 472, 1926.
38 Paech, K.: Planta 24, 78, 1936.
39 Schumacher, W.: Planta 5, 161, 1928.
40 Paech, K.: Planta 22, 794, 1934.
41 Thimann, K. V. und Y. Edmondson: Arch. Biochem. 25, 79, 1950.
42 Thimann, K. V. und Mitarb.: Arch. Biochem. 34, 305, 1951.
43 Moewus, F.: Angew. Chemie 65, 561, 1953.
44 Mann, P. J. G. und W. R. Smithies: Biochemic. J. 61, 89, 1951.
45 Orloff, H. D.: Chemic. Rev. 54, 374, 1954.
46 Ehrensvärd, G.: Svensk Kem. Tidskr. 66, 9, 1954.
47 Kluyver, A. J. und Mitarb. Enzymologia (Nd) 7, 257, 1939.

Lebenslauf

Am 23. 9. 1926 wurde ich als Sohn des Werkmeisters Paul Schraudolf und seiner Ehefrau Maria geb. Rösch in Heilbronn/N. geboren. Dort besuchte ich 4 Jahre die Grundschule und trat im Frühjahr 1936 in die Robert-Mayer-Oberschule ein. Ab 1943 war ich als Luftwaffenhelfer eingesetzt und erhielt bei meiner Einberufung zum RAD im Februar 1944 als Abgangszeugnis den Reifevermerk. Im März 1945 kam ich in Kriegsgefangenschaft und wurde im Dezember 1947 wegen schwerer Erkrankung entlassen.

1949 bestand ich an meiner alten Schule die Reifeprüfung. Vom Wintersemester 1949/50 bis Wintersemester 1950/51 studierte ich an der Justus-Liebig - Hochschule in Gießen Botanik, Zoologie und Chemie und bin seit dem Sommersemester 1951 an der Universität Tübingen immatrikuliert.

VERLAG HEILBRONNER STIMME